

Bull. Acad. Vét. de France, 1987, 60, 293-303

COMMUNICATIONS

Apport des nouvelles biotechniques à la production des vaccins vétérinaires

par **Ph. DESMETTRE***

RÉSUMÉ

Les biotechniques récemment développées : recombinaison génétique, synthèse peptidique, fournissent de nouvelles opportunités pour la préparation des vaccins vétérinaires destinés à la prévention des infections virales ou bactériennes et des infestations parasitaires.

Qu'il s'agisse de la préparation de vaccins « vivants », de vaccins « inactivés » ou de vaccins de « sous-unités ou purifiés », la recombinaison génétique fournit l'opportunité de produire par biosynthèse des antigènes vaccinaux dont l'obtention est actuellement encore hypothéquée par leur rareté, les difficultés et coûts de leur extraction et de leur purification et les contraintes de sécurité biologique liées à leur production.

La synthèse peptidique en permettant de reproduire certains des déterminants portés par les antigènes vaccinaux fournit une autre alternative pour la préparation de vaccins.

Associés à de nouveaux modes d'administration qui pourraient contribuer à accroître leur efficacité en même temps qu'à simplifier les programmes de vaccination, les vaccins du futur représenteront un nouveau progrès dans la prévention et l'éradication des maladies infectieuses et parasitaires vétérinaires.

Mots clés : Biotechniques nouvelles - Vaccins vétérinaires.

* **Ph. DESMETTRE**, Directeur des Recherches, Rhône-Mérieux, 254, rue Marcel-Mérieux, 69342 Lyon cedex 07.

SUMMARY**THE USE OF NEW BIOTECHNIQUES IN THE PRODUCTION
OF VETERINARY VACCINES**

Recently developed biotechniques such as genetic recombination and peptide synthesis present new opportunities for the preparation of veterinary vaccines for use in the prevention of viral or bacterial infection and parasite infestation.

Be it for the preparation of "live" or "inactivated" vaccines, or "sub-unit or purified" vaccines, genetic recombination permits the production of vaccinating antigens by biosynthesis, the obtention of such antigens is still hindered by their scarcity, difficulties and cost of their extraction and of their purification and the constraints of biological security involved in their production.

By enabling the reproduction of certain determinants carried by the vaccinating antigens, peptide synthesis furnishes another alternative for vaccine preparation.

When associated to new delivery systems which can both contribute to an increase in efficacy and a simplification of vaccination schedules, these vaccines of the future will represent further progress in the prevention and eradication of infections veterinary diseases and parasites.

Key words : New biotechnics - Veterinary vaccines.

I. INTRODUCTION

Largement utilisée dans la lutte contre les grandes enzooties et plus généralement dans la prévention des maladies infectieuses, la vaccination permet de protéger l'animal en activant au moyen d'antigènes appropriés ses mécanismes spécifiques de défense contre les infections virales ou bactériennes et les infestations parasitaires.

La découverte de la vaccination est probablement très ancienne puisque les Chinois puis à leur suite les Perses avaient, semble-t-il, remarqué depuis des temps reculés que, chez l'homme, un cas de variole n'était qu'exceptionnellement suivi d'un deuxième cas. Ils en avaient déduit qu'il était possible de conférer une protection contre la variole en pratiquant la variolisation, c'est-à-dire l'inoculation à des sujets sains du pus provenant des pustules varioliques d'individus faiblement atteints.

La variolisation n'étant pas toujours dépourvue de risque le médecin anglais Edward JENNER eut en 1796 l'idée de remplacer la variolisation par la vaccination. Il avait en effet découvert que les travailleurs de ferme au contact d'animaux atteints de variole bovine étaient résistants au virus de la variole. Il décida d'inoculer à l'homme du pus de lésion de variole bovine découvrant ainsi la vaccination en même temps que l'utilisation d'un agent hétérologue pour induire sans risque une protection.

Près d'un siècle plus tard Louis PASTEUR reprenant les travaux de JENNER et d'un certain nombre d'autres pionniers, devait préciser le

concept de vaccination et en établir les bases scientifiques en même temps qu'il devait développer des vaccins préparés à partir de micro-organismes dont la virulence se trouvait atténuée par l'action conjuguée du vieillissement et d'agents physiques (chaleur) ou chimiques (phénol).

Vaccin du choléra des poules, vaccin du rouget du porc, vaccin du charbon bactérien furent ainsi parmi les principales applications vétérinaires des travaux de PASTEUR qui devaient trouver leur apogée avec la première vaccination antirabique pratiquée chez l'homme sur la personne du jeune Joseph MEISTER le 5 juillet 1885.

Un nouveau pas décisif dans l'histoire de la vaccination devait être franchi en 1923 par le vétérinaire Gaston RAMON avec la démonstration de la possibilité de détoxifier par l'action combinée de la chaleur et du formol certaines toxines bactériennes et d'utiliser les anatoxines ainsi obtenues pour la préparation de vaccins.

Confronté à la nécessité de potentialiser le pouvoir inducteur de l'immunité des anatoxines, RAMON devait en outre découvrir les substances adjuvantes de l'immunité ouvrant ainsi la voie à la préparation des vaccins à bactéries ou virus inactivés.

D'abord essentiellement bactériens les vaccins allaient progressivement devenir également viraux avec l'avènement des méthodes de cultures cellulaires permettant la multiplication des virus. Ce fut d'abord à la suite des travaux de WALDMAN, la mise au point par FRENKEL en 1952 du premier vaccin inactivé de la fièvre aphteuse produit à partir de virus cultivés sur lambeaux d'épithélium lingual de bovins et celle par Jonas SALK en 1954 du premier vaccin inactivé de la poliomyélite produit à partir de virus multipliés sur cellules rénales de singe.

Depuis peu, le champ d'application des vaccins s'est également étendu aux hémoparasites avec la découverte des antigènes impliqués dans la protection et la mise au point de techniques de cultures appropriées.

II. LES DIFFERENTS TYPES DE VACCINS : « VIVANTS, « INACTIVES », « SOUS-UNITES »

Les vaccins viraux bactériens ou parasitaires actuellement disponibles sont de trois types :

- vaccins à virus ou micro-organismes vivants improprement mais commodément appelés « vaccins vivants » ;
- vaccins à virus ou micro-organismes inactivés ou « vaccins inactivés » ;
- vaccins préparés à partir de fractions immunogènes protectrices plus ou moins purifiées et dénommés « vaccins sous-unités » ou « vaccins purifiés ».

2.1. VACCINS « VIVANTS »

Les vaccins « vivants » sont préparés à partir de souches de virus ou de micro-organismes dont le pouvoir pathogène, atténué à la faveur de mutations spontanées ou induites, les font qualifier de « souches atténuées ». Qu'il s'agisse de mutants spontanés ou de mutants induits tous procèdent d'un phénomène lié au hasard et les souches vaccinales qui en résultent sont le fruit d'un long et souvent fastidieux travail de sélection.

Ces vaccins, qui sont en règle générale doués d'une excellente activité et ne nécessitent le plus souvent qu'une seule intervention vaccinale pour protéger l'animal pendant toute la durée de sa vie économique, sont peu stables et nécessitent des conditions de conservation adaptées.

En outre, indépendamment d'un certain pouvoir pathogène résiduel qui dépend du niveau d'atténuation de la souche vaccinale utilisée, ils présentent *le risque d'une restauration du pouvoir pathogène de cette souche par réversion de la mutation initiale.*

2.2. VACCINS « INACTIVÉS »

Les vaccins « inactivés » sont préparés à partir de virus, de micro-organismes ou de toxines traités par des agents inactivants physiques (chaleur...) ou le plus souvent chimiques (formaldéhyde, éthylène imine, β -propiolactone...) et dont le pouvoir immunogène et protecteur est le plus souvent exacerbé par l'utilisation de substances adjuvantes de l'immunité (hydroxyde d'alumine, saponine, émulsions d'huiles végétales ou minérales...).

2.3. VACCINS « SOUS-UNITÉS » OU « PURIFIÉS »

Préparés à partir de fractions immunogènes plus ou moins purifiées extraites des virus ou des micro-organismes ou libérées dans les milieux de culture (antigènes solubles) de tels vaccins sont dépourvus d'effets adverses. Les fractions utilisées étant en règle générale insuffisamment immunogènes, leur pouvoir protecteur doit cependant se trouver renforcé par l'utilisation d'adjuvants de l'immunité appropriés.

III. DE NOUVELLES OPPORTUNITES POUR LA PREPARATION DES VACCINS : LA RECOMBINAISON GENETIQUE, LA SYNTHÈSE PEPTIDIQUE

Qu'ils soient « vivants », « inactivés » ou préparés à partir de « sous-unités » plus ou moins purifiées, les vaccins ont tous pour dénominateur commun un ou plusieurs antigènes immunogènes qui en constituent le ou les principes actifs et sont à l'origine du pouvoir protecteur.

L'obtention de quantités suffisantes, dans des conditions économiquement acceptables, des principes actifs est dans un certain nombre de cas le facteur qui limite ou rend impossible le développement des vaccins.

La nécessité de disposer de quantités importantes de principes actifs est en outre à l'origine de la manipulation de quantités au moins équivalentes d'agents infectieux, ce qui impose la mise en place de moyens de confinement propres à assurer la protection de l'environnement contre une éventuelle dissémination de ces agents (cas du virus de la fièvre aphteuse) en même temps que la protection des personnels qui les manipulent (cas du virus de la rage).

Les plus récents progrès de la biochimie, de la biologie et de la génétique moléculaire, et de l'immunologie fournissent des options tout à fait nouvelles pour la préparation des principes actifs dont l'utilisation se trouve actuellement encore hypothéquée par les difficultés, les coûts ou les contraintes de sécurité liés à leur production.

3.1. RECOMBINAISON GÉNÉTIQUE

La recombinaison génétique, qui repose sur l'universalité du code génétique, résulte de la mise en œuvre d'un ensemble de techniques qui permettent de fusionner des fragments d'ADN ou gènes provenant d'espèces différentes et d'obtenir leur expression dans un système hôte. L'organisme transformé par l'ADN recombiné qui résulte de la fusion des gènes dispose ainsi d'un nouveau patrimoine génétique sous la dépendance duquel il peut synthétiser des molécules de spécificités parfois très différentes de celles originellement produites.

Au plan technique le principe de la recombinaison génétique appliquée à la préparation des vaccins est en lui-même assez simple.

La première étape consiste en l'identification et en l'isolement ou la synthèse du gène qui code pour la protéine ou la glycoprotéine, responsable du pouvoir immunogène de l'agent infectieux considéré.

Dans un certain nombre de cas ce gène peut être directement excisé du génome qui le contient au moyen d'enzymes de restriction, véritables ciseaux biologiques, qui coupent l'ADN en des points précis. Le gène ainsi isolé peut alors être inséré dans une molécule d'ADN (le vecteur) qui sert de véhicule pour le transfert dans une cellule hôte (bactérie, levure, cellule de mammifères...).

La cellule hôte ainsi transformée assure alors la transcription et la traduction du gène étranger en même temps que celle de son propre génome, et produit la protéine ou la glycoprotéine correspondante en même temps que ses propres constituants.

L'universalité du code génétique permet d'obtenir la synthèse de protéines virales, bactériennes ou parasitaires par des bactéries, des

levures, ou des cellules de mammifères, ou la construction de chimères virales qui expriment alors les antigènes étrangers en même temps que leurs propres constituants.

3.1.1. APPLICATION AUX VACCINS DES COLIBACILLOSES NÉONATALES

Le premier exemple d'application de la recombinaison génétique à la préparation de nouveaux vaccins vétérinaires est représenté par la récente commercialisation de vaccins des colibacilloses néonatales du veau et du porcelet préparés à partir de bactéries incorporant un ADN recombiné.

Affectant le veau ou le porcelet dans les jours qui suivent la naissance, l'entérite colibacillaire néonatale résulte de la colonisation de l'intestin grêle par certaines souches d'*Escherichia coli* dites entérotoxigènes. Ces souches qui s'attachent aux bordures en brosse des entérocytes au moyen de facteurs d'attachement ou pili, produisent des toxines entérotropes qui sont à l'origine d'une fuite d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale dont la traduction clinique est une diarrhée suivie d'une intense déshydratation.

Par vaccination des femelles gestantes au moyen des facteurs d'attachement portés par ces souches, il est possible d'obtenir la transmission colostrale, à l'animal nouveau-né, d'anticorps spécifiques qui préviennent la colonisation de l'intestin par les souches entérotoxigènes, et par voie de conséquence la sécrétion des entérotoxines au contact de leurs récepteurs.

Localisés sur des plasmides (molécules d'ADN extrachromosomiques) portés par les souches entérotoxigènes, des fragments d'ADN portant les gènes codant pour les facteurs d'attachement ont pu être isolés et intégrés dans des vecteurs d'expression, qui ont ensuite été utilisés pour transformer des bactéries hôtes. Les bactéries hôtes ainsi transformées synthétisent de manière spécifique et avec une grande régularité d'importantes quantités d'antigènes immunogènes directement utilisables pour la préparation de vaccins.

3.1.2. APPLICATION AU VACCIN DE LA RAGE

L'exemple du vaccin de la rage obtenu par recombinaison génétique est tout aussi illustratif de l'apport de cette technique à la préparation des vaccins de demain.

L'antigène du virus de la rage à l'origine de la protection conférée par les vaccins est une glycoprotéine qui forme des projections ou spicules qui hérissent la surface du virion.

Le virus rabique ayant un génome constitué d'ARN et ce type d'acide nucléique ne pouvant être directement utilisé dans les techniques de recombinaison génétique, une copie du génome viral sous forme d'ADN

complémentaire a dans un premier temps été réalisée. Le gène codant pour la glycoprotéine protectrice a ensuite été localisé sur cet ADN par déduction de sa séquence à partir de la séquence peptidique (enchaînement d'acides aminés) de la glycoprotéine.

Ainsi localisé et isolé, le gène codant pour la glycoprotéine du virus de la rage a pu être inséré dans le génome d'un virus de la vaccine.

La chimère virale obtenue conserve les propriétés de multiplication du virus de la vaccine qui produit en même temps que ses propres constituant la glycoprotéine rabique qui est exposée à la surface du virion et des cellules infectées.

Un tel virus recombinant peut donc tout à la fois être utilisé pour la préparation de vaccins « vivants », de vaccins « inactivés » ou pour la préparation d'un vaccin de « sous-unité » utilisant la seule glycoprotéine.

Actif par voie parentérale, le recombinant non inactivé l'est aussi par voie orale ce qui permet d'envisager son utilisation, mélangé à des appâts, comme vaccin vivant pour l'immunisation des animaux qui constituent les réservoirs naturels du virus rabique (renard, raton laveur, mouffette...).

L'importance du génome du virus de la vaccine et la démonstration de la possibilité de déléter une partie de ce génome sans perturber la capacité de multiplication du virus permet en outre d'associer plusieurs gènes étrangers sur un même génome donnant ainsi naissance à des souches vaccinales polyvalentes susceptibles d'immuniser contre les principales infections d'une même espèce animale.

3.1.3. APPLICATION AU VACCIN DE LA FIÈVRE APHTEUSE

Bien qu'actuellement encore au stade de la mise au point la recombinaison génétique appliquée à la préparation de nouveaux vaccins de la fièvre aphteuse fournit un autre exemple d'application potentielle de cette technique.

Le caractère épizootique et l'incidence économique toujours très lourde de la fièvre aphteuse obligent les pays infectés ou potentiellement exposés à entretenir à un niveau élevé l'immunité des espèces sensibles.

Si la vaccination conserve dans ces conditions toute son actualité, le pouvoir infectieux exceptionnellement élevé du virus et les risques potentiels de dissémination à partir des laboratoires producteurs nécessitent pour ces laboratoires la mise en œuvre de coûteuses mesures d'isolement propres à assurer la sécurité des manipulations. La recombinaison génétique en permettant la production des vaccins en l'absence de manipulation des virus devrait fournir aux laboratoires producteurs, entre autres opportunités, celle de s'affranchir de ces mesures.

L'extrême variabilité antigénique du virus de la fièvre aphteuse complique la tâche des laboratoires producteurs de vaccins. Sept types : O, A, C, Asia, SAT 1, SAT 2, SAT 3, et environ soixante sous-types ont à ce jour été recensés qui rendent le typage des souches indispensable préalablement à la décision d'utilisation d'un vaccin qui le plus souvent doit être polyvalent.

Les spécificités à l'origine de la grande variabilité antigénique des souches sont portées par les protéines qui forment la capsid du virus. Parmi ces protéines l'une d'entre elles dénommée VP 1 induit la production d'anticorps neutralisants et est à l'origine de la protection conférée par la vaccination.

Comme dans le cas du virus de la rage le gène codant pour cette protéine a pu être localisé sur l'ARN qui constitue le génome viral. L'insertion de l'ADN complémentaire de ce gène, dans différents systèmes vecteurs, a permis d'obtenir la synthèse de la protéine VP 1 par différents systèmes hôtes : bactéries ou levures.

Produites en l'absence de toute infection virale, des protéines VP 1 correspondantes à différentes spécificités antigéniques ont ainsi pu être obtenues et dans certaines conditions ont pu être montrées inductrices d'anticorps neutralisants et protectrices.

Si de nombreux travaux restent encore à réaliser pour obtenir par recombinaison génétique un vaccin de la fièvre aphteuse dont la polyvalence et l'efficacité puissent rivaliser avec celles des vaccins existants, ces premiers résultats apparaissent d'ores et déjà encourageants.

3.2. SYNTHÈSE PEPTIDIQUE

La conjonction des récents progrès de la biochimie qui permettent d'établir la séquence des protéines (soit directement, soit à partir de la séquence des gènes qui les codent), et des progrès des méthodes d'analyse immunologique qui permettent de localiser les déterminants antigéniques portés par ces protéines, ouvre une autre voie tout à fait originale pour la préparation des vaccins. Ces déterminants sont en effet constitués de courts enchaînements d'acides aminés ou peptides qui peuvent désormais être synthétisés par voie chimique.

3.2.1. APPLICATION AU VACCIN DE LA FIÈVRE APHTEUSE

Le cas de la protéine VP 1 du virus de la fièvre aphteuse est à cet égard exemplaire.

Cette protéine comporte deux déterminants antigéniques majeurs qui ont pu être localisés très précisément sur sa séquence. Courts peptides constitués respectivement d'environ une vingtaine et une douzaine d'acides aminés ces déterminants ont pu être synthétisés.

Reconnus par les anticorps anti-virus ou les anticorps anti-protéine VP 1 ces peptides ne sont, en raison de leur faible masse moléculaire, pas directement immunogènes. Couplés à une molécule porteuse destinée à favoriser leur présentation au système immunitaire et mélangés à de puissants adjuvants de l'immunité, ces peptides induisent la synthèse d'anticorps neutralisants et ont, dans un nombre encore limité de cas, permis d'induire une protection laissant ainsi augurer de la possibilité d'obtenir des vaccins par voie chimique.

IV. CONCLUSION

Si des progrès décisifs ont d'ores et déjà été enregistrés pour la production des vaccins avec :

— l'industrialisation des procédés de multiplication des virus, des bactéries ou plus récemment des hémoparasites ;

— le fractionnement et la purification des principes actifs, et l'utilisation d'adjuvants de l'immunité qui conjuguent innocuité et efficacité, *de nouvelles perspectives d'amélioration des vaccins existants ou de développement de nouveaux vaccins résultent des potentialités d'application des nouvelles biotechniques : recombinaison génétique et synthèse peptidique.*

Dans ces perspectives, les vaccins « vivants » du futur ne seront plus préparés à partir de souches atténuées par des processus liés au hasard et qui indépendamment du procédé de sélection mis en œuvre ne permettent pas de connaître avec précision les raisons de l'atténuation et présentent en outre le risque potentiel d'une restauration du pouvoir pathogène initial des souches.

Ces vaccins seront au contraire préparés à partir de souches dont l'atténuation résultera d'une construction par les techniques de la recombinaison génétique.

Construits sur le modèle du virus recombinant de la vaccine utilisé pour l'immunisation contre la rage, de tels recombinants pourront être obtenus à partir de virus à ADN : poxvirus, herpèsvirus ou adénovirus, ou encore à partir de bactéries qui en fonction de leurs spécificités d'espèces ou de leurs tropismes pourront, selon les cas, fournir l'opportunité de stimuler l'immunité générale ou locale des espèces animales concernées.

L'association de plusieurs déterminants sur un même micro-organisme recombinant fournira en outre la possibilité de préparer des vaccins vivants polyvalents éventuellement dirigés tout à la fois contre des virus, des bactéries et des parasites.

De la même manière, les vaccins « inactivés » pourront être directement obtenus par inactivation des recombinants viraux ou bactériens,

ou résulter de l'expression, par des systèmes hôtes appropriés, des immunogènes protecteurs normalement portés par les virus, bactéries ou parasites.

Produits en quantités souvent très importantes ces immunogènes devront préalablement à leur utilisation comme principes actifs destinés à la formulation des vaccins faire l'objet d'une extraction et d'une purification par voie physico-chimique ou immunologique. A moins bien sûr qu'ils ne résultent d'une synthèse chimique et ne soient de ce fait directement obtenus à l'état pur.

Outre la prévention des maladies infectieuses, la possibilité d'induire une réponse immunitaire spécifique vis-à-vis de courts peptides synthétiques fournit également l'opportunité d'inhiber l'activité des différentes hormones peptidiques impliquées dans la régulation de la croissance ou des fonctions de reproduction des animaux. Castration immunologique ou amélioration des performances zootechniques des animaux pourraient ainsi résulter du développement des vaccins synthétiques.

Enfin, disposer de nouveaux modes de préparation des principes actifs entrant dans la formulation des vaccins ne représenterait qu'un progrès limité sans la mise au point de nouveaux modes d'administration qui contribueront à accroître l'efficacité des vaccins et à simplifier les programmes de vaccination.

De telles études sont d'ores et déjà engagées et c'est sans nul doute de la conjonction des nouveaux modes de préparation des principes actifs et des nouveaux modes d'administration que naîtront les vaccins du futur.

BIBLIOGRAPHIE

GÉNÉRALITÉS

Recombinaison génétique

KOURILSKI (P.). — Le génie génétique. *La Recherche*, 1980, 11, 390-402.

GILBERT (W.), VILLA-KOMAROFF (L.). — Des bactéries recombinantes pour fabriquer des protéines utiles. *Pour la Science*, 1980, 2, 82-94.

TOLSTOSHEV (P.), LECOCQ (J.P.). — Génie génétique et industries biomédicales. *La Recherche*, 1984, 15, 630-641.

DAVIES (J.). — Genetic engineering and vaccines. *Ann. Inst. Pasteur Immunol.*, 1985, 136D, 143-150.

CAVANAGH (D.). — Viral and bacterial vectors of immunogenes. *Vaccine*, 1985, 3, 45-48.

Synthèse peptidique

LERNER (R.). — Les vaccins de synthèse. *Pour la Science*, 1983, 66, 72-84.

ARNON (R.), SELA (M.). — Les antigènes et vaccins synthétiques. *La Recherche*, 1983, 14, 346-357.

APPLICATIONS À LA PRÉPARATION DES VACCINS

Colibacilloses néonatales

- DE GRAAF (F.K.), KRENN (B.E.), KLAASEN (P.). — Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of K 99 fimbriae. *Infect. Immun.*, 1984, 43, 508-514.
- MOOI (F.R.), WIJFJES (A.), DE GRAAF (F.K.). — Identification and characterization of precursors in the biosynthesis of K 88ab fimbriae of *E. coli*. *J. Bact.*, 1983, 154, 41-49.

Rage

- BLANCOU (J.), KIENY (M.P.), LATHE (R.), LECOCQ (J.P.), PASTORET (R.P.), SOULEBOT (J.P.), DESMETTRE (P.). — Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. *Nature*, 1986, 322, 373-375.
- KIENY (M.P.), LATHE (R.), DRILLIEN (R.), SPEHNER (D.), SKORY (S.), SCHMIDT (D.), WIKTOR (T.), KOPROWSKI (H.), LECOCQ (J.P.). — Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature*, 1984, 312, 163-166.
- WIKTOR (T.J.), MAC FARLAN (R.I.), REAGAN (K.J.), DIETZSCHOLD (M.), CURTIS (P.J.), WUNNER (W.H.), KIENY (M.P.), LATHE (R.), LECOCQ (J.P.), MACKETT (M.), MOSS (B.), KOPROWSKI (H.). — Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 7194-7198.

Fièvre aphteuse

- KLEID (D.), YANSURA (D.), SMALL (B.), DOWBENKO (D.), MOORE (D.), GRUBMAN (M.), Mc KERCHER (P.), MORGAN (D.), ROBERTSON (B.), BACHRACH (H.). — Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: Responses in cattle and swine. *Science*, 1981, 214, 1125-1129.
- Mc KERCHER (P.), MOORE (D.), MORGAN (D.), ROBERTSON (B.), CALLIS (J.), KLEID (D.), SHIRE (S.), YANSURA (D.), DOWBENKO (D.), SMALL (B.). — Dose response evaluation of a genetically engineered foot-and-mouth disease virus polypeptide immunogen in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 1985, 46, 587-590.
- ROWLANDS (D.). — Un vaccin synthétique contre la fièvre aphteuse. *La Recherche*, 1985, 16, 94-95.
- BITTLE (J.), HOUGHTEN (R.), ALEXANDER (H.), SHINNICK (T.), SUTCLIFFE (J.G.), LERNER (R.), ROWLANDS (D.), BROWN (F.). — Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature*, 1982, 298, 30-33.
- DI MARCHI (R.), BROOKE (G.), GALE (C.), CRACKNELL (V.), DOEL (T.), MOWAT (N.). — Protection of cattle against foot-and-mouth disease by synthetic peptide. *Science*, 1986, 232, 639-641.
-